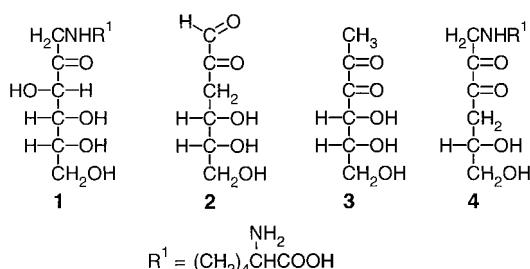


Unerwartete Carbonyl-Mobilität in Aminoketosen: der Schlüssel zu wichtigen Maillard-Quervernetzungsprodukten**

Klaus M. Biemel, Jürgen Conrad und Markus O. Lederer*

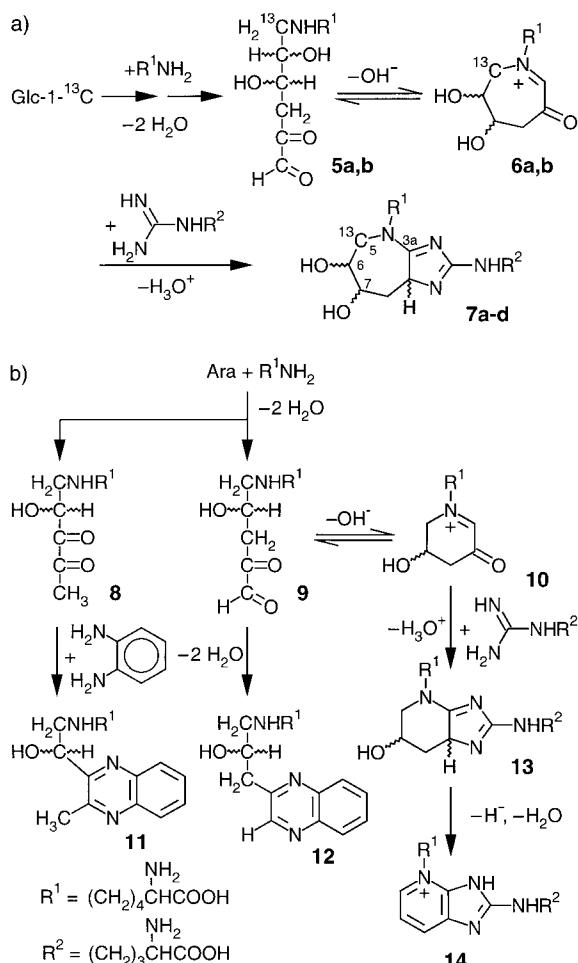
Die kovalente Quervernetzung von Proteinen ist eine der wichtigsten Modifikationen, die durch Maillard-Prozesse, also Reaktionen reduzierender Zucker mit Aminen, verursacht werden. Kovalent quervernetzte Proteine gehören zu den so genannten „Advanced Glycation End Products“ (AGEs), die oft aus Aminoketosen **1** (Schema 1) über hochreaktive Dicarbonylintermediate wie **2–4** entstehen.^[1–3] In langlebigem Bindegewebe und Matrixkomponenten akkumulieren



Schema 1. Das Amadori-Produkt 1-Desoxy-1-(*N*⁶-lysino)-D-fructose **1** und die in der Literatur bereits beschriebenen Desoxyosone **2–4**.

die AGEs altersabhängig und werden in verstärktem Maß bei Diabetes gebildet.^[4] Sie können zelluläre Rezeptoren aktivieren^[5] und zu krankhaften Veränderungen beitragen, die mit dem generellen Alterungsprozeß sowie Spätkomplikationen bei Diabetes, Arteriosklerose und Morbus Alzheimer in Zusammenhang stehen.^[1, 6–8] Um den Einfluss der Maillard-Reaktion auf diese Prozesse besser zu verstehen und um effektive Therapiemethoden gegen die AGE-Akkumulation im Gewebe zu entwickeln, ist es unabdingbar, die Bildungsmechanismen wichtiger Proteinquervernetzungsprodukte (Crosslinks) aufzuklären.

Wir haben kürzlich über die Bildung der Lysin-Arginin-Crosslinks Glucosepan **7** (Schema 2a), Pentosinan **13** und Pentosidin **14** (Schema 2b) aus den entsprechenden Kohlenhydraten und Aminoketosen (Amadori-Verbindungen) berichtet.^[2] Keines dieser Quervernetzungsprodukte entsteht aus den authentischen 3-Desoxyosonen wie 3-Desoxygluco-



Schema 2. a) Reaktionsweg für die Bildung des Lysin-Arginin-Crosslinks **7a–d**. b) Identifizierung der neuen Pentose-Didesoxyosone **8** und **9**. Aus Verbindung **9** wird vermutlich durch Ringschluß 6-(3-Hydroxy-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1-pyridinyl)norleucin **10** gebildet, das dann mit der Argininseitenkette zu Pentosinan **13** und schließlich zu Pentosidin **14** reagiert.

son **2** (3-DOG, Schema 1), obwohl sie plausible Vorstufen wären. Daher wurde ein neuer Weg für die Entstehung von **7** aus der Aminoketose **1** postuliert,^[2] der aufzeigt, wie sich der siebengliedrige Ring von Glucosepan schließen könnte.

Verbesserte chromatographische Verfahren erlaubten jetzt, vier Stereoisomere **a–d** von Glucosepan **7** zu trennen und die Strukturen zweifelsfrei NMR-spektroskopisch zu charakterisieren;^[9a] bislang war lediglich die Trennung eines Stereoisomerenpaares **a,b** gelungen.^[10] Dieser Befund steht im Widerspruch zum postulierten Bildungsweg, der unter Beibehaltung der Stereochemie an C6 und C7 aus dem nativen Kohlenhydrat nur zu zwei Glucosepanisomeren führen würde. Bei der Bildung von **7** muss also die Konfiguration der stereogenen Zentren C6 oder/und C7 verloren gegangen sein, sodass vier bzw. acht Diastereoisomere resultieren. Aufgrund der großen Distanz zu den *S*-konfigurierten Stereozentren der Aminosäuren, konnten jedoch die 6,7,8a-Stereoisomere mit identischer relativer aber umgekehrter absoluter Konfiguration an diesen Zentren weder chromatographisch getrennt noch NMR-spektroskopisch unterschieden werden.^[9b] Daher sind bei freier C6,7,8a-Konfiguration nur vier der acht möglichen Diastereoisomere von **7** unterscheidbar.

[*] Priv.-Doz. Dr. M. O. Lederer, K. M. Biemel

Institut für Lebensmittelchemie (170), Universität Hohenheim
Garbenstraße 28, 70593 Stuttgart (Deutschland)
Fax: (+49) 711-459-4096

E-mail: ledererm@uni-hohenheim.de

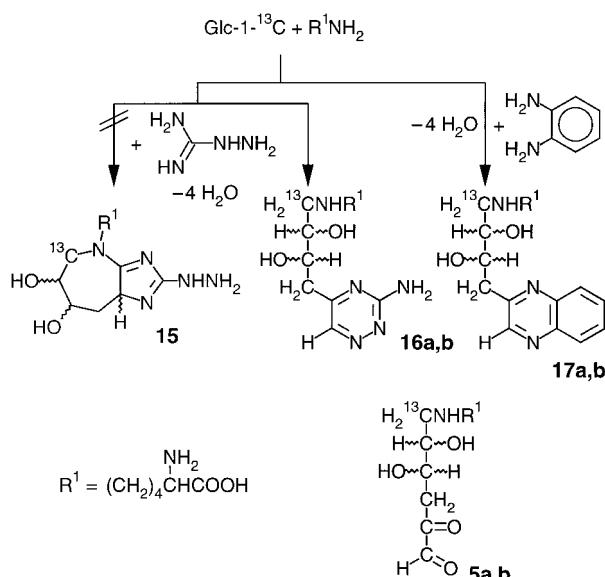
Dr. J. Conrad

Institut für Chemie (130)
Garbenstraße 30, 70593 Stuttgart (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Frau S. Reeb, Institut für Chemie, Universität Hohenheim, und J. Rebell, Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart, danken wir für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Um zu klären, ob C3a oder C5 in **7** vom C1 der D-Glucose stammt, wurden Inkubationen mit ^{13}C -markierter Glucose (D-Glucose-1- ^{13}C) durchgeführt. Anders als erwartet erwies sich C5 als die markierte Position, was den ursprünglich postulierten Bildungsweg^[2] endgültig widerlegte. Die Ergebnisse aus Reaktionen von D-Glucose-1- ^{13}C und Lysin mit Aminoguanidin (AG) anstelle von Arginin waren noch überraschender. Das erwartete Glucosepan-Analogon **15** (Schema 3) konnte durch LC-(ESI)MS (Flüssigchromatographie-Electrospray-Massenspektrometrie-Kopplung) nicht identifiziert



werden; stattdessen wurde ein Doppelpeak mit einem Quasimolekülion $[M+H]^+$ bei m/z 329 und einem für Aminotriazine typischen Ultraviolet-Spektrum detektiert. Die NMR-Analyse bewies eindeutig, dass es sich bei diesem Produkt um N^6 -[4-(3-Amino-1,2,4-triazin-5-yl)-2,3-dihydroxybutyl]lysin (**16a,b**, Daten nicht gezeigt) handelt und nicht um das Triazinderivat der 1,4-Didesoxy-1-(N^6 -lysin)-D-hexo-2,3-diulose **4**. Da AG ein bewährtes Abfangreagens für α -Dicarbonylverbindungen ist, haben wir offensichtlich das neue Didesoxyoson **5a,b** identifiziert, das aussieht wie ein auf den Kopf gestelltes 3-DOG **2**, dessen terminale OH-Funktion durch N^6 der Lysinseitenkette substituiert ist. Zur Absicherung dieses Befundes wurde in einem weiteren Experiment *o*-Phenyldiamin (OPD) anstelle von AG als Abfangreagens für **5a,b** eingesetzt. Tatsächlich wurde N^6 -[2,3-Dihydroxy-4-(2-chinoxaliny)butyl]lysin **17a,b**,^[9c] analog zu **16a,b**, in Form zweier unterschiedbarer Stereoisomere erhalten; weitere Diastereoisomere, bedingt durch das S-konfigurierte Stereozentrum im Lysinrest, ließen sich aus oben genannten Gründen nicht differenzieren. Die ^{13}C -Markierung war sowohl bei **16a,b** als auch bei **17a,b** direkt mit N^6 der Lysinseitenkette verknüpft. Die Bildung von **5a,b** aus der Amino-ketose **1** erfordert somit Carbonyl-Verschiebungen entlang des gesamten Kohlenhydratgerüsts, die zu einem Verlust der ursprünglichen Stereochemie der H-C-OH-Gruppen führen.

Dieser Reaktionsweg wird belegt durch Ergebnisse von Experimenten mit D_2O als Lösungsmittel. Durch LC-(ESI)MS und NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass Isotopomere von **17a,b** entstehen, die D-C-OH-Einheiten enthalten, d.h., an beiden Stereozentren hat im Zuge der Keto-Enol-Tautomerisierungen ein H/D-Austausch stattgefunden. Zu klären bleibt noch, auf welcher Stufe der Reaktionssequenz die Wassereliminierung an C4 bei **1** erfolgt und ob **4** eine Zwischenstufe ist. Derivate von **4** mit primären Aminsubstituenten sind selbst als Chinoxaline relativ instabil.^[11] Disaccharide wie Lactose (O - β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcP) und Maltose (O - α -D-GlcP-(1 \rightarrow 4)-D-GlcP) liefern ebenfalls problemlos **5a,b**, da die 1 \rightarrow 4-glycosidische Bindung durch Eliminierung des O-Substituenten an C4 bei diesem Prozess gespalten wird.

In unseren Modellinkubationen wird das neue Didesoxyoson **5a,b** in höheren Ausbeuten gebildet als 3-DOG **2**.^[9d] Da **2** bislang als das in Lebensmitteln wie auch in vivo quantitativ wichtigste Desoxyoson galt, haben sich die meisten Untersuchungen auf diese Verbindung konzentriert. Die Bedeutung von **5a,b** für die Proteinquervernetzung in vivo wird durch folgende Argumente offensichtlich: Einerseits liefert diese erste identifizierte Lysin-gebundene α -Dicarbonylverbindung in Gegenwart von Argininresten das Hauptquervernetzungsprodukt Glucosepan **7a-d**. Der entsprechende Reaktionsweg zu **7a-d** ist in Schema 2a gezeigt; das intramolekulare Aldimin **6a,b** stellt eine plausible Zwischenstufe dar. Die Bildung von vier unterscheidbaren Diastereoisomeren von **7** wird aufgrund der Vorstufe **5a,b** leicht verständlich. Andererseits ist es unwahrscheinlich, dass proteingebundenes **5a,b** durch Reduktase-Katalyse in vivo genauso entgiftet werden kann wie **2**,^[12] und daher ein persistentes Glykierungsagens darstellt. Diese Hypothese wird durch unsere Untersuchungen von wichtigen Crosslinks in humanem Serumalbumin und Augenlinsenprotein gestützt. Sie weisen eindeutig **7** als dominierende Verbindung aus, während die entsprechende von 3-DOG **2** abgeleitete Struktur N^6 -[2-[(4S)-4-Ammonio-5-oxido-5-oxopentyl]amino]-5-[$(2S,3R)$ -2,3,4-trihydroxybutyl]-3,5-dihydro-4H-imidazol-4-yliden]-L-lysinat (DOGD-IC)^[2] nur in Spuren nachweisbar ist. Die Bildung von **7a-d** unter physiologischen Bedingungen ist bemerkenswert, da sie eine Folge von leicht ablaufenden Enolisierungs- und Dehydratisierungsschritten nahe legt, die von **1** zu **5a,b** führen. Die damit verbundenen weitreichenden Carbonyl-Shifts wurden in der Maillard-Chemie für die Bildung zahlreicher AGEs oft postuliert,^[1] konnten bislang aber nicht bewiesen werden. Das Didesoxyoson **5a,b** ist daher nicht nur die entscheidende Vorstufe für die Bildung von **7**, sondern vermutlich auch das Schlüsselintermediat für zahlreiche weitere Maillard-Produkte.

Die Homologie zwischen der Bildung von Glucosepan **7** und Pentosidin **14** hat uns dazu veranlasst, in Inkubationsgemischen von Arabinose mit Lysin und OPD nach dem entsprechenden Didesoxyoson N^6 -(2-Hydroxy-4,5-dioxopen-tetyl)lysin **9** zu suchen (Schema 2b). N^6 -(2-Hydroxy-3-(2-chinoxaliny)propyl)lysin **12** konnte tatsächlich in guter Ausbeute isoliert werden, sodass **9** eine plausible Vorstufe von Pentosan **13** ist. Die weitere Umsetzung von **13** zu **14** wurde bereits detailliert untersucht.^[2] Überraschenderweise haben

wir aus diesen Inkubationsgemischen zusätzlich N^6 -(2-Hydroxy-2-(3-methyl-2-chinoxalinyl)ethyl)lysin **11** isoliert und zwar in dreifach höherer Ausbeute als **12**.^[9e] Da für Hexosen keine zu **11** homologe Struktur nachgewiesen werden konnte, scheint die Bildung von Didesoxyosonen wie N^6 -(2-Hydroxy-3,4-dioxopentyl)lysin **8** für Pentosen spezifisch zu sein.

Die geschilderten Befunde belegen zweifelsfrei, dass die neuen Didesoxyosone **5a,b** und **9** wichtige Zwischenstufen bei der Bildung bedeutender Proteinquervernetzungsprodukte sind. Die Bildung derartiger Strukturen aus Pentosen und Hexosen lässt sich somit über einen allgemeinen, gemeinsamen Reaktionsweg erklären, der auch zu einem besseren Verständnis fortgeschrittener Maillard-Prozesse beitragen kann.

Experimentelles

Chromatographische und spektroskopische Arbeitsverfahren: Die Geräte und Methoden für die präparative Hochleistungsfliessigkeitschromatographie (HPLC), LC-(ESI)MS und NMR-Spektroskopie sind detailliert in Lit. [2] beschrieben. Ammoniumformiat-Puffer (10 mM, pH 4.0)-MeOH-Gradienten wurden für alle LC-Trennungen eingesetzt. Feinmassenbestimmungen wurden bei einer Auflösung von 1010 (10%-Tal-Definition) und mit Polyethylenglycol 350 Monomethylether als Massenreferenz durchgeführt. Folgende Scan-Bereiche und Referenzsignale wurden zur Kalibration herangezogen: **17a,b**, m/z 335–435, m/z 341.2175, 358.2441, 385.2438, 402.2703, 429.2700; **11** und **12**, m/z 290–390, m/z 297.1913, 314.2179, 341.2175, 358.2441, 385.2438.

7a–d: Die Synthese mit nativer D-Glucose und die Isolierung der *tert*-Butoxycarbonyl(Boc)-Derivate von **7** sowie die Abspaltung der Boc-Gruppen wurde wie in Lit. [10] beschrieben durchgeführt. Man erhält zwei Rohprodukte, die mit präparativer HPLC gereinigt wurden (Gradient: % MeOH (t [min]) 0(0)-5(5–7)-0(8–13); Detektion bei 254 nm). Die Fraktionen mit t_R = 5.4, 6.2, 7.7 und 8.9 min ergeben nach Lyophilisierung **7c**·3HCOOH (7.0 mg, 0.012 mmol, 0.3%), **7a**·3HCOOH (24.3 mg, 0.043 mmol, 1.1%), **7b**·3HCOOH (14.9 mg, 0.026 mmol, 0.7%) bzw. **7d**·3HCOOH (4.7 mg, 0.008 mmol, 0.2%). Die Synthese (Syntheseansatz auf 1/4 reduziert) wurde mit D-Glucose-1-¹³C (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA) wiederholt und die Produkte analog isoliert.

17a,b, **11** und **12**: D-Glucose (360 mg, 2 mmol) bzw. D-Arabinose (300 mg, 2 mmol), N^6 -tBoc-L-Lysin (1.47 g, 6 mmol), *o*-Phenyldiamin (430 mg, 4 mmol), Diethyltriaminopentaessigsäure (5 mg, 0.013 mmol) und Phosphatpuffer (1.6 g, 1 mmol, pH 7.4) wurden in Wasser (10 mL) gelöst. Die jeweiligen Mischungen wurden mit Argon entgast, 2 d bei 70 °C gehalten und mit präparativer HPLC gereinigt (Gradient: % MeOH (t [min]) 5(0)-70(20)-100(22–25)-5(28–35); Detektion bei 318 nm). Fraktionen mit t_R = 19.9 min (Inkubation mit D-Glucose), t_R = 20.1 und 20.9 min (Inkubation mit D-Arabinose) wurden lyophilisiert, in 3 N HCl (2 mL) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gehalten. Den pH-Wert stellte man durch langsame Zugabe von festem NaHCO₃ auf 7 ein, füllt das Volumen auf 4 mL auf und reinigt mit präparativer HPLC (Gradient: % MeOH (t [min]) 5(0)-55(12)-100(15–18)-5(20–25); Detektion bei 318 nm). Im Fall der D-Glucose-Inkubation erhält man nach Lyophilisierung aus der Fraktion bei t_R = 10.0 min die Verbindung **17a,b**·HCOOH (unmarkiert, 36.5 mg, 0.089 mmol, 4.5%); LC-(ESI)MS (Gradient: % MeOH (t [min]) 5(0)-95(30–35)-5(40–45), Cone Voltage 40 V): **17a**, t_R = 8.3 min, m/z (%) 401 (3) [$M+K$]⁺, 385 (4) [$M+Na$]⁺, 363 (100) [$M+H$]⁺, 219 (8), 187 (17); **17b**, t_R = 8.5 min, m/z (%) 401 (4) [$M+K$]⁺, 385 (6) [$M+Na$]⁺, 363 (100) [$M+H$]⁺, 219 (12), 187 (14); Feinmasse (Mittelwert aus 11 Messungen ± Standardabweichung): **17a,b**, m/z 363.2034 ± 0.0007 [$M+H$]⁺ (363.2032, berechnet für C₁₈H₂₇N₄O₄). Die Herstellung wurde mit D-Glucose-1-¹³C (Syntheseansatz auf 1/7 reduziert) wiederholt und die Produkte analog isoliert. Im Fall der Inkubation mit D-Arabinose lieferten die Fraktionen mit t_R = 10.5 und 11.3 min nach Lyophilisierung **11**·HCOOH (12.3 mg, 0.033 mmol, 1.6%) bzw. **12**·HCOOH (4.8 mg, 0.013 mmol, 0.6%); LC-

(ESI)MS (Gradient und Cone Voltage, siehe oben): **11**, t_R = 7.5 min, m/z (%) 371 (1) [$M+K$]⁺, 355 (2) [$M+Na$]⁺, 333 (45) [$M+H$]⁺, 175 (100), 159 (30); **12**, t_R = 8.3 min, m/z (%) 371 (1) [$M+K$]⁺, 355 (1) [$M+Na$]⁺, 333 (100) [$M+H$]⁺, 315 (5), 189 (5), 187 (4); Feinmasse (Mittelwert aus 10 Messungen ± Standardabweichung): **11**, m/z 333.1931 ± 0.0007 [$M+H$]⁺; **12**, m/z 333.1935 ± 0.0010 [$M+H$]⁺ (333.1927, berechnet für C₁₇H₂₅N₄O₃).

Eingegangen am 5. September 2001 [Z 17857]

- [1] F. Ledl, E. Schleicher, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 597–626; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 565–594.
- [2] K. M. Biemel, O. Reihl, J. Conrad, M. O. Lederer, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23405–23412.
- [3] a) D. B. Shin, F. Hayase, H. Kato, *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 1451–1458; b) M. A. Glomb, C. Pfahler, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 515–523; c) S. Vasan, X. Zhang, A. Kapurniotu, J. Bernhagen, S. Teichberg, J. Basgen, D. Wagle, D. Shih, I. Terlecky, R. Bucala, A. Cerami, J. Egan, P. Ulrich, *Nature* **1996**, *382*, 275–278; d) R. H. Nagaraj, I. N. Shipanova, F. M. Faust, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19338–19345; e) M. O. Lederer, R. G. Klaiber, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2499–2507; f) H. Odani, T. Shinzato, J. Usami, Y. Matsumoto, E. Brinkmann-Frye, J. W. Baynes, K. Maeda, *FEBS Lett.* **1998**, *427*, 381–385.
- [4] V. M. Monnier, R. R. Kohn, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 583–587.
- [5] a) A. M. Schmidt, O. Hori, J. Brett, S. D. Yan, J. L. Wautier, D. Stern, *Arterioscler. Thromb.* **1994**, *14*, 1521–1528; b) T. Kislinger, C. F. Fu, B. Huber, W. Qu, A. Taguchi, S. D. Yan, M. Hofmann, S. F. Yan, M. Pischetsrieder, D. Stern, A. M. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 31740–31749; c) A. M. Schmidt, S. D. Yan, S. F. Yan, D. M. Stern, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1498*, 99–111.
- [6] J. W. Baynes, S. R. Thorpe, *Diabetes* **1999**, *48*, 1–9.
- [7] C. A. L. S. Colaco, *The Glycation Hypothesis of Atherosclerosis*, Springer, Heidelberg, **1997**.
- [8] a) S. D. Yan, X. Chen, J. Fu, M. Chen, H. Zhu, A. Roher, T. Slattery, L. Zhao, M. Nagashima, J. Morser, A. Miglieli, P. Nawroth, D. Stern, A. M. Schmidt, *Nature* **1996**, *382*, 685–691; b) A. Takeda, T. Yasuda, T. Miyata, Y. Goto, M. Wakai, M. Watanabe, Y. Yasuda, K. Horie, T. Inagaki, M. Doyu, K. Maeda, G. Sobue, *Acta Neuropathol.* **1998**, *95*, 555–558.
- [9] Siehe Hintergrundinformationen für a) ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von **7a–d** (Tabelle 1); b) Überlegungen zur Zahl der beobachtbaren Diastereoisomere von **7** und Zuordnung ihrer relativen Konfiguration (Tabellen 1, 2 und Abbildung 1); c) ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von **17a,b** (Tabelle 3); d) LC-Chromatogramme (Abbildung 2); e) ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von **11** und **12** (Tabelle 3).
- [10] M. O. Lederer, H. P. Bühler, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1081–1088.
- [11] B. Huber, F. Ledl, *Carbohydr. Res.* **1990**, *204*, 215–220.
- [12] M. S. Feather, T. G. Flynn, K. A. Munro, T. J. Kubieski, D. J. Walton, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1244*, 10–16.